

Aus der Abteilung für Zahnerhaltung
(Vorstand: Prof. Dr. A. Kröncke)
der Klinik und Poliklinik
für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
der Universität Erlangen-Nürnberg
(Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Steinhardt)

**Vergleichende Untersuchungen
über den anaeroben Abbau von Saccharose,
Glucose und Fructose durch isolierte
Mundhöhlen-Streptokokken**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Ursula Hildegard Meschede, geb. Baron

aus

Bad Godesberg

Gedruckt mit der Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. A. Kröncke

Referent: Prof. Dr. A. Kröncke

Tag der mündlichen Prüfung: 23. 5. 1969

Herrn Prof. Dr. A. Kröncke bin ich für die Überlassung des Themas und die Freistellung eines Arbeitsplatzes sehr verbunden und danke für seine stets freundliche Hilfe bei der Durchführung und Fertigstellung der Arbeit.

- I. Einleitung und Problemstellung
- II. Literaturübersicht
- III. Methode und Material
 - 1. Prinzipien der Methode
 - 2. Bakterienkulturen und Nährmedien
 - 3. Ansätze und Versuchsanordnung
- IV. Ergebnisse
- V. Diskussion
- VI. Zusammenfassung
- VII. Schrifttum

I. Einleitung und Problemstellung

Die große Bedeutung der in den Plaques auftretenden, sauren intermediären Stoffwechselprodukte, die beim Kohlenhydratabbau durch Mikroorganismen entstehen, ist heute wohl von den meisten Autoren unbestritten. PMEIJER und MANLY (21) brachten in vitro den Nachweis, daß Plaques, die von Zähnen anfälliger Personen isoliert wurden, bei Kontakt mit Glucose und Saccharose zur Korrosion von Zahnhartsubstanz befähigt sind.

Nach heutiger Auffassung sind im Wesentlichen zwei Faktoren für das Ausmaß der Säurebildung in den Plaques verantwortlich zu machen: einmal die Kohlenhydratmengen, die im Speichel auf aerobem Wege nicht oder nur verlangsamt abgebaut werden und somit den Plaques zur Verfügung stehen; zum anderen der Gehalt der Plaques an Bakterienstämmen - vor allem Streptokokken - die befähigt sind, extra- und intrazelluläre Polysaccharide zu synthetisieren. Plaquesstreptokokken mit diesen Eigenschaften können ihre selbstsynthetisierten Polysaccharide bei mangelnder Kohlenhydratzufuhr aus dem Speichel wieder zu Milchsäure abbauen. Damit ist eine über längere Zeit dauernde Ätzwirkung auf die Zahnhartsubstanz gewährleistet.

Die Säuremengen, die in den Plaques aus einem Zucker gebildet werden, stellen einen gewissen Maßstab für die kariogenen Eigenschaften dieses Zuckers dar. Bei fast allen bisherigen Untersuchungen über den anaeroben Abbau von Kohlenhydraten mit Hilfe der manometrischen Methode diente Glucose als Substrat. Die mit der Nahrung zugeführten Zucker bestehen jedoch auch aus anderen Zuckern, zum Beispiel aus Rohrzucker und Fructose.

K.G. KÖNIG (13) untersuchte die kariogene Wirkung einiger Zucker im Tierversuch. Dabei konnte experimentell gezeigt werden, daß Saccharose stärker kariogen wirkt als Glucose, Lactose und Maltose. Die unterschiedliche kariogene Wirkung von Saccharose wird durch eine erleichterte Polysaccharidbildung aus Disacchariden erklärt. Es ist aber nicht ohne weiteres verständlich, daß sich bei diesen Tierversuchen die Fructose als ebenso kariogen zeigte wie die stärkste kariogene Noxe, die Saccharose.

Unsere Untersuchungen sollen prüfen, 1.) ob die drei Zucker Saccharose, Glucose und Fructose durch isolierte Mundhöhlenstreptokokken unterschiedlich schnell abgebaut werden, und 2.) ob zwischen den fünf verschiedenen Streptokokkenstämmen unterschiedliche Abbaugeschwindigkeiten fest-

gestellt werden können. Als Maß für die Abbaugeschwindigkeit soll die CO_2 - Freisetzung aus einem Bikarbonatpuffer im anaeroben Warburgansatz dienen.

II. Literaturübersicht

Die Karies wird heute wohl überwiegend als chemoparasitärer Prozeß aufgefaßt. Damit ist einmal die Bedeutung der Speichelflora und zum anderen der chemische Vorgang in der Mundhöhle herausgestellt. Nach der alten MILLER'schen Theorie (18) wird der Beginn der Zahnkaries als einfacher Entkalkungsvorgang an der Zahnhartsubstanz verstanden, der durch Gärungssäuren verursacht wird. Als wichtigste Säure ist seit MILLER die Milchsäure, das Gärungsprodukt aus Kohlenhydraten, angesprochen worden.

Bei Betrachtung der Gärung muß aber davon ausgegangen werden, daß erst durch die fermentative Wirkung von Bakterien auf bestimmte Nahrungsstoffe, besonders Kohlenhydrate eine Säureentwicklung entsteht. GUSTAFSSON (11) zeigte vor allem durch Untersuchungen an keimfrei aufgezogenen Ratten, daß die Entstehung der Zahnkaries an Bakterien gebunden ist, und selbst bei Fütterung mit kariogener Kost mit hohem Zuckergehalt ohne Anwesenheit von Bakterien keine Karies erzeugt werden konnte.

GUSTAFSSON und Mitarbeiter (12) brachten den klinischen Beweis, daß bei einzelnen Kohlenhydratformen Unterschiede bestehen, die durch die physikalische Konsistenz be-

dingt sind. Klebrige Kostformen, besonders zwischen den Mahlzeiten eingenommen, verursachen einen erhöhten Kariesbefall. Das entspricht somit der von LUNQVIST (16) experimentell nachgewiesenen, verlängerten "oral sugar clearance" bei kariesanfälligen Personen.

So rückten die nach der Nahrungsaufnahme verbleibenden Zucker im Speichel in den Vordergrund des Interesses. Reiner, bakterienfreier Speichel vermag Glucose nicht abzubauen (KRÖNCKE, 14). Die Mikroorganismen des Speichels konnten somit für den Abbau von Nahrungsresten, insbesondere der Zucker, verantwortlich gemacht werden. Untersuchungen der Stoffwechselvorgänge ergaben, daß alle Fermente des Kohlenhydratabbaus, mit Ausnahme der Amylase (KRÖNCKE, LÄSSIG, 15) signifikante Unterschiede bei kariesanfälligen und kariesresistenten Personen zeigen (NEUBAUER und Mitarbeiter, 20; NAUJOKS und Mitarbeiter, 19; BRAMSTEDT und NAUJOKS, 1; BRAMSTEDT und AHRENS, 2). Wichtige Fermente, vor allem des intermediären Kohlenhydratstoffwechsels, sind im Speichel bei Anfälligen deutlich gehemmt, was eine vollständige Verbrennung der Substrate einschränkt. Differierende Eliminationsgeschwindigkeiten bei beiden Personengruppen konnten somit bio-

chemisch erklärt werden (BRAMSTEDT und NAUJOKS,1 und BRAMSTEDT und Mitarbeiter,3). Durch die verminderten Fermentaktivitäten, die aber bei den einzelnen Bakterienstämmen unterschiedlich verteilt sind, kommt es naturgemäß zu einer längeren Verweildauer der Nahrungszucker in der Mundhöhle kariesanfälliger Personen (BRAMSTEDT und AHRENS,2). Die verbleibenden Zucker werden in größerer Menge und über eine längere Zeit vom Speichel den Plaques angeboten (NAUJOKS und Mitarbeiter,19) und zum Abbau zur Verfügung gestellt.

In den Plaques herrschen anaerobe Zustände, so daß es nur zu einer Vergärung dieser Zucker kommen kann, als deren Endprodukt die Milchsäure entsteht. STRÅLFORS (24) untersuchte eingehend die Säureentwicklung in den Plaques. Dabei stellte er fest, daß Glucose schnell in die Plaques eindringt und innerhalb kurzer Zeit zu Milchsäure abgebaut wird.

Je höher nun die Zuckermengen sind, die im Speichel nach Nahrungsaufnahme zurückbleiben, desto höher ist das Substratangebot an die Plaques mit folgender größerer Säurebildung. Die Verbindung des aeroben Speichelsystems mit dem anaeroben Plaquesystem ist also für die Säureent-

wicklung in den Plaques von großer Bedeutung.

Da Milchsäure in den Plaques aus Glucose auf dem Embden-Meyerhof-Weg gebildet wird, muß bei starken Milchsäurebildnern auch eine entsprechend hohe Aldolaseaktivität gefunden werden. In Versuchen von BRAMSTEDT und Mitarbeitern (4) konnte das bestätigt werden. Die gefundenen Milchsäurewerte, ebenso die CO_2 -Produktion, liegen bei Plaques von kariesresistenten und kariesanfälligen Personen im Warburg-Versuch etwa gleich hoch. Somit besteht eine Differenz bei Kariesresistenten zwischen Aldolaseaktivität und Milchsäurebildung via Embden-Meyerhof-Weg. Andere Abbauewege werden diskutiert (RANKE und Mitarbeiter, 23).

Als Bausteine der intrazellulären Polysaccharide wurden allein Glucosemoleküle angegeben (GIBBONS und KAPSIMALIS, 8). Durch Untersuchungen von BRAMSTEDT und Mitarbeitern (5) ergab sich insofern ein Widerspruch, als sie auch immer Rhamnose im Polysaccharidmolekül bei Stämmen fanden, die aus Plaques kariesanfälliger Personen isoliert worden waren. Rhamnosefreie, also ausschließlich aus Glucose aufgebaute Polysaccharide fanden sich bei resistenten Stämmen.

Nach den Untersuchungen von GIBBONS und Mitarbeitern(10) konnten kariogene Streptokokkenstämme aus Rohrzucker große Mengen extrazelluläre, nicht-dialysierbare Kohlenhydrate in Form einer Kapsel synthetisieren. Es wird darauf hingewiesen, daß die Bildung einer Kapsel für den kariösen Prozeß von Bedeutung sein könnte.

Nach den bisherigen Untersuchungsergebnissen ist anzunehmen, daß Plaques von kariesanfälligen Personen zahlenmäßig mehr Polysaccharid-synthetisierender Bakterien enthalten als Plaques kariesresistenter Personen (GIBBONS und SOCRANSKY, 7). Die Polysaccharide werden bei reichlichem Kohlenhydratangebot aus dem Speichel bei gleichzeitig ungünstigen Wachstumsbedingungen gebildet, und sie dienen nach Ansicht der Autoren als Energiereserven. In Zeiten einer geringen oder zeitweilig fehlenden Kohlenhydratzufuhr werden die intrazellulären Polysaccharide von den Bakterien zu Milchsäure abgebaut. Die entstehenden Säuren können den pH vermindern und auch bei in vitro ständig fließendem Puffer über mehrere Stunden unter pH 6 halten (GIBBONS, 9).

Aufgrund der MILLER'schen Theorie (18) hat man immer wieder der der Milchsäure besondere Bedeutung beigemessen.

MATHIS (17) und FOSDICK (6) haben auf die Möglichkeit hingewiesen, daß auch Vorstufen der Milchsäure im Gärungsablauf für die kariöse Zerstörung wichtig sein könnten, und speziell Brenztraubensäure erwähnt. Daneben könnten aber auch noch andere entstehende Säuren, wie Essig-, Butter- und Ameisensäure eine Rolle spielen. RANKE und Mitarbeiter (22) wiesen nach der Inkubation von Plaques mit C_{14} -uniformmarkierter Glucose im Warburgansatz mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie neben der Milchsäure andere organische Säuren nach, wobei sämtliche gefundenen Säuren radioaktiv waren.

III. Methode und Material

1. Prinzipien der Methode

Otto WARBURG entwickelte 1926 die Manometer-Technik für seine Untersuchungen über den Stoffwechsel von Tumoren. Im folgenden kann auf die Beschreibung technischer Einzelheiten der Methode verzichtet werden, da sie bei UMBREIT und Mitarbeitern(25) ausführlich beschrieben worden ist. Es werden lediglich die bei den vorliegenden Untersuchungen angewandten besonderen Versuchsbedingungen erläutert.

Die zu untersuchende Substanz wird bei temperatur-konstanten Bedingungen in einem Reaktionsgefäß geschüttelt, das an ein Manometer angeschlossen ist. Durch die unter anaeroben Bedingungen im Reaktionsgemisch entstehenden intermediären Säuren erfolgt eine Freisetzung von CO_2 aus einem Bikarbonat-Puffer, die manometrisch als Druckänderung gemessen werden kann. Die Ablesungen erfolgen stets bei gleichem Gasvolumen innerhalb des Manometersystems, also jeweils bei gleichem Manometerstand des geschlossenen Schenkels. Aus den gemessenen Druckänderungen können Rückschlüsse

auf die Art und Menge der gebildeten Intermediärprodukte und die Intensität bzw. Geschwindigkeit der ablaufenden Umsetzungen gemacht werden. Zu jeder Meßreihe gehört ein Kontrollgefäß zur Registrierung von Veränderungen der Temperatur, des Luftdruckes und von Manometerschwankungen während des Versuches. Die abgelesenen Werte dieses Thermobarometers werden mit den übrigen Werten der Meßreihe zur Korrektur verrechnet. Außerdem läuft ein Gefäß mit nicht reagierendem Inhalt zur Kontrolle eventueller Gasumsätze aus Nebenreaktionen mit.

2. Bakterienkulturen und Nährmedien

Für unsere Untersuchungen über das Säurebildungsvermögen aus Glucose, Saccharose und Fructose verwenden wir die Bakterienstämme St/200, St/205, St/249, St/291 und St/292 aus der Abteilung für experimentelle Zahnheilkunde der Universitätsklinik und Poliklinik für ZMK-Krankheiten Würzburg; sie stehen auch dort unter Kultur.

Die Stämme St/200 (*Sc. viridans*, Typ I) und Stamm St/205 (*Sc. Serol.* Gruppe M) wurden von kariesanfälligen Personen isoliert. Über die Herkunft der Stämme

St/291 (Sc. viridans, Typ II) und St/292 (Sc. viridans, Typ I) ist uns weiter nichts bekannt. Der Stamm St/249 wurde von einer kariesanfälligen Person isoliert; er war nicht eingrupprierbar. Die Stämme St/200, 205, 291 und 292 sind vermutlich nicht kariogen, während es sich bei Stamm St/249 um einen Stamm mit kariogenen Eigenschaften handeln dürfte.

Die Mikroorganismen wurden als Stichkultur in verschlossenen Röhrchen gehalten und jeden achten Tag auf einen neuen, festen Nährboden überimpft. Nach einer 24-stündigen Bebrütung bei einer Temperatur von 37°C wurden die Kulturen bis zur nächsten Überimpfung im Kühlschrank bei einer Temperatur von 4°C aufbewahrt, um ein zu starkes Auswachsen der Keime zu vermeiden. Als fester Nährboden diente für die Bakterienstämme:

Agar	12,0 g
CaCO ₃	0,5 g
Thioglycollate Broth	29,0 g
Glucose	4,5 g
Aqua dest. ad	1 000,0 g

Die Menge pro Kulturröhrchen betrug 15 ml.

Für unsere laufenden Stoffwechseluntersuchungen überimpften wir aus einer solchen Stichkultur die Mikroorganismen in eine fest verschließbare Flasche auf einen flüssigen Nährboden (80 ml), der mit Ausnahme des Agars die gleiche Zusammensetzung wie das feste Nährmedium aufwies. Die Inkubation im Brutschrank bei 37°C erfolgte zwischen 16 und 24 Stunden lang. Nach STRÅLFORS (24) wurden die höchsten Fermentaktivitäten bei Streptokokken zu Beginn des geometrischen Wachstums gemessen, und es wurde deshalb die günstigste Bebrütungsdauer mit 15 bis 18 Stunden angegeben. Bei einer Bebrütungsdauer von 16 bis 24 Stunden konnten wir keine Beziehungen zwischen Bebrütungszeit und den ablaufenden Reaktionen feststellen. Bei einer Bebrütungszeit von 48 Stunden ließ sich allerdings eine Gasproduktion kaum nachweisen.

Die Bakterien wurden aus dem flüssigen Nährmedium während 10 Minuten bei einer Umdrehung von 3 000/Min. abzentrifugiert und der Überstand abgegossen. Die Keime wurden in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, wiederum abzentrifugiert und der Überstand ebenfalls abgegossen. Das Zentrifugat wurde in physiologischer NaCl-Lösung aufge-

schwemmt. Um vergleichbare Werte zu bekommen, wurden die Bakteriensuspensionen 2 Minuten lang im MSE-Ultraschall-Desintegrator homogenisiert und die Keimzahl der betreffenden Kulturen im Photometer "Eppendorf" gegen einen Trübungsstandard so bestimmt, daß bei allen Untersuchungen die gleiche Trübung der Suspension vorhanden war. Auf diese Weise sind alle gemessenen Werte miteinander vergleichbar, da pro ml Flüssigkeit etwa die gleiche Keimzahl angenommen werden muß.

3. Ansätze und Versuchsanordnung

Das Gesamtflüssigkeitsvolumen beträgt in allen Reaktionsgefäßen 2,5 ml und setzt sich wie folgt zusammen:

- | | |
|----------------------|---|
| 1. Thermobarometer | 2,5 ml Bikarbonatpuffer
(98,9 mg NaHCO_3 ad 100 ml
Aqua bidest.) |
| 2. Bakterienleerwert | 1,0 ml Bakteriensuspension
1,25 ml Bikarbonatpuffer
0,25 ml Aqua bidest. |

3. Meßsystem	1,0 ml Bakteriensuspension
	1,25 ml Bikarbonatpuffer
	0,25 ml Substrat
Die Substratzusätze	D(+) Glucose (Merck 8342) 1/100 m,
	D(+) Saccharose (Merck) 1/200 m und
	1/100 m Fructose (Boehringer)

werden bei Versuchsbeginn in die Seitenarme gegeben. Es werden 1/100 bzw. 1/200 m Konzentrationen verwendet, bezogen auf die Gesamtmenge im Ansatz.

Die an die Manometer angeschlossenen und beschickten Reaktionsgefäße werden in ein Wasserbad von konstant 37°C gehängt und mit einer Frequenz von 120/Min. geschüttelt, damit sich eine gleichmäßige Ausgangstemperatur einstellt. Während dieser Vorbereitungszeit wird mit einem Gasgemisch aus 95% N₂ und 5% CO₂ 10 Minuten lang begast. Dann werden die Systeme geschlossen und die Ausgangspunkte der Messung eingestellt. Erst 30 Minuten nach Versuchsbeginn werden aus dem Seitenarm die Substratzusätze ins Hauptgefäß zugegeben. Die nach regelmäßigen Zeitabständen abgelesenen Manometerwerte werden mit dem Thermobarometer korrigiert. Die Umrechnung in $\mu\text{l CO}_2$ geschieht mit Hilfe der einzelnen Gefäßkonstanten, die bei unserem System von 1,09 bis 1,41 betrugen.

IV. Ergebnisse

In Warburg-Versuchen wurde Glucose, Saccharose, Fructose unter anaeroben Bedingungen auf das Ausmaß ihrer Abbaugeschwindigkeit durch isolierte Streptokokkenstämme untersucht. Als Maß für einen erfolgten Abbau wurde die CO_2 -Produktion aus einem Bikarbonatpuffer gewertet; CO_2 wird aus einem Puffer durch die bei der Glycolyse entstehenden Intermediärsäuren freigesetzt.

In Tabelle 1 ist die Anzahl der Einzelversuche aufgeführt, aus denen wir die Durchschnittswerte pro Stamm und Zucker ermittelten. Zudem ist die Anzahl der Versuchstage aufgeführt, auf die sich die jeweilige Gesamtsumme der Warburg-Ansätze verteilt.

Tabelle 1

Stamm	200	205	249	291	292
Glucose	14	10	16	13	10
Saccharose	14	12	15	13	9
Fructose	13	10	12	11	9
Anzahl der Versuchstage	5	3	5	4	3

Dabei ist noch zu erwähnen, daß die Stämme St/200, St/205, St/291 und St/292 bezüglich der verschiedenen Versuchstage erhebliche Schwankungen in Geschwindigkeit und absoluter Höhe der Umsetzungen der verschiedenen Zucker aufweisen. Nur unwesentliche Schwankungen zeigt der Stamm St/200. Das geht aber aus den summarischen Durchschnittswerten nicht hervor; deshalb demonstrieren wir als Beispiel den Stamm St/291 in den Abbildungen 1 bis 4, bei dem die größten Unterschiede an den verschiedenen Tagen gemessen wurden. Die CO_2 -Werte pro Tag und Zucker wurden aus mindestens zwei Warburggefäßen ermittelt.

Die Untersuchungen ergaben immer bei allen Stämmen durch Zusatz von Glucose, Saccharose und Fructose eine Steigerung der CO_2 -Produktion als Ausdruck einer aktivierten Glykolyse. Aus den Abbildungen 5 bis 7 geht hervor, daß die Steigerung der CO_2 -Produktion für den Stamm St/249 nach Zusatz von jeweils Glucose, Saccharose und Fructose am größten ist; der Stamm St/292 weist nach Substratzusatz die geringste Steigerung der CO_2 -Produktion auf. Die Stämme St/200, St/205 und St/291 zeigen eine ähnliche Steigerung der CO_2 -Produktion, ausgenommen St/291 nach Zusatz von Fructose.

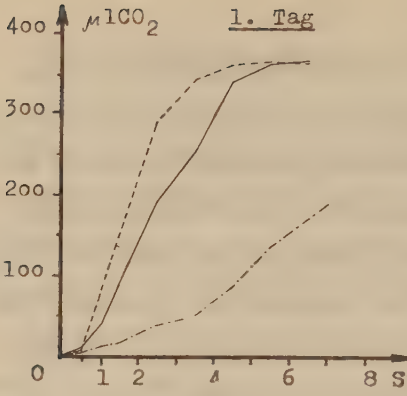


Abb. 1

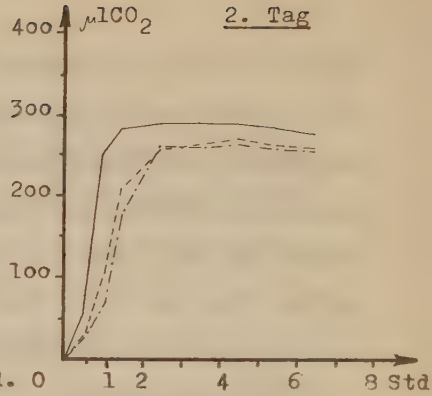


Abb. 2

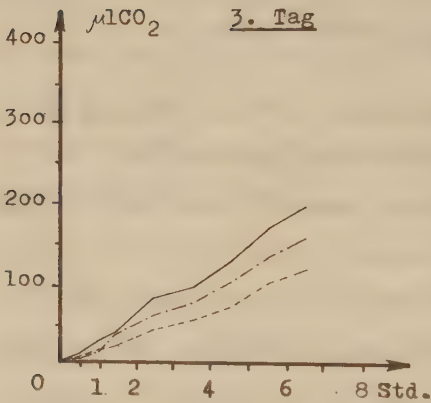


Abb. 3

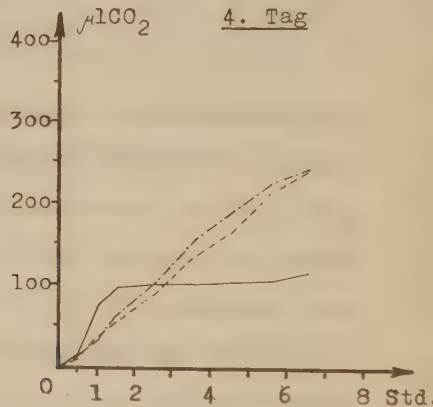


Abb. 4

Abb. 1 bis 4: CO_2 -Freisetzung aus einem Bikarbonat-Puffer beim anaeroben Abbau von Glucose (—), Saccharose (-----) und Fructose (— · — · —) durch den Stamm St/291 an vier verschiedenen Tagen.

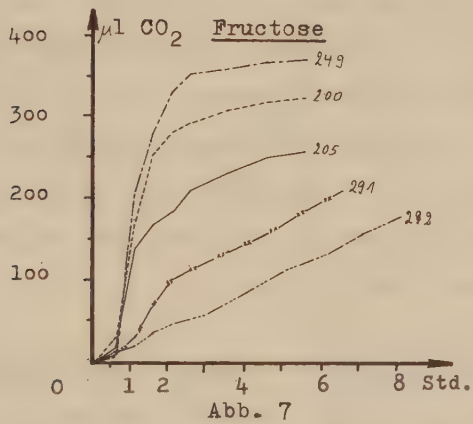
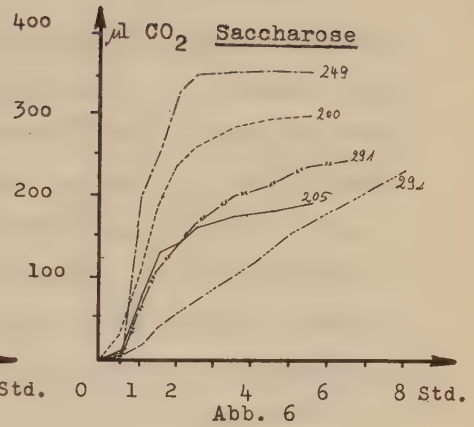
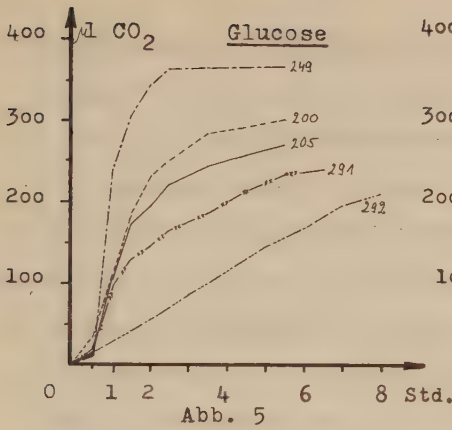
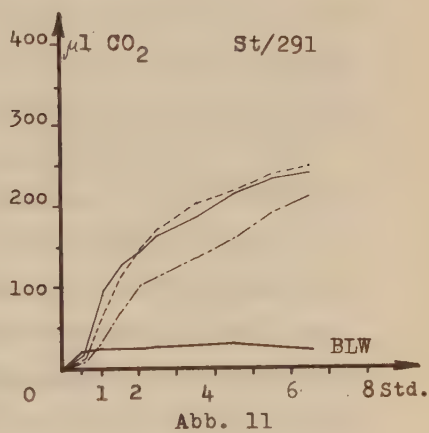
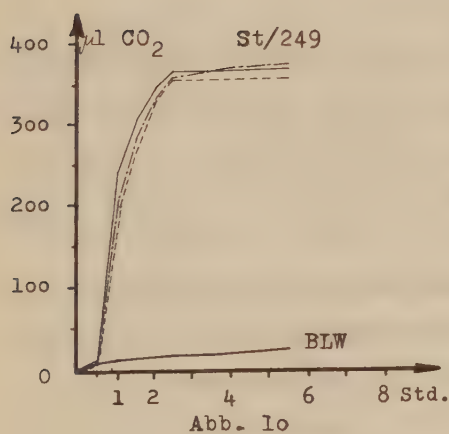
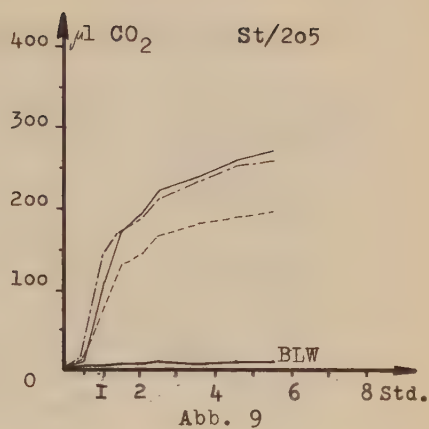
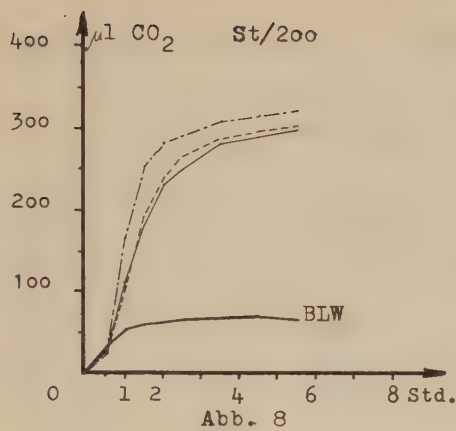


Abb. 5 bis 7: Vergleich der CO_2 -Freisetzung aus den drei verschiedenen Zuckern Glucose, Saccharose und Fructose durch die isolierten Bakterienstämme St/200, St/205, St/249, St/291 und St/292.

Die Geschwindigkeiten der Umsetzungen bei verschiedener Substratzugabe in Bezug auf den einzelnen Stamm demonstrieren für die fünf verschiedenen Stämme die Abbildungen 8 bis 12. Bei den einzelnen Untersuchungen lief jeweils ein Warburggefäß ohne Substratzusatz als Bakterienleerwert mit. Diese Werte werden bei den einzelnen Stämmen mitaufgeführt als Maß für Umsetzungen aus Nebenreaktionen, die auch saure Produkte freisetzen können. Die Abbildungen 8 bis 12 zeigen, daß Stamm St/249 für alle drei Zucker einen annähernd gleichen Kurvenverlauf zeigt. Die Schwankungen liegen sicher innerhalb der Fehlergrenze. Die größten Differenzen weist Stamm St/291 auf, wobei durch Fructosezusatz die geringste und durch Glucose die größte Steigerung erreicht wird. Bei den Stämmen St/200, St/205 und St/292 wird durch verschiedene Substratzugabe jeweils eine ähnliche Steigerung der CO_2 -Produktion erreicht.

In Tabelle 2 wurden die Anfangssteigungen der Kurven nach der Formel $m = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$ errechnet; dabei ist x_1 der Zeitpunkt der Substratzugabe. $y_2 - y_1$ entspricht der CO_2 -Entwicklung während dieser Zeit.



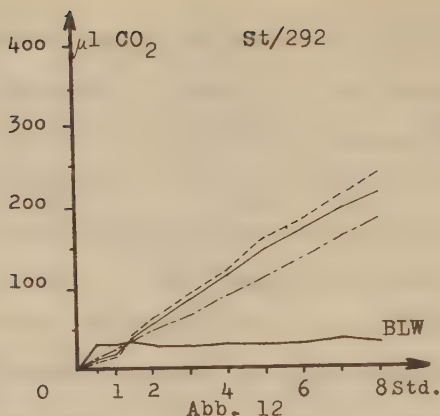


Abb. 8 bis 12: CO_2 -Freisetzung durch die fünf isolierten Bakterienstämme St/200, St/205, St/249, St/291 und St/292 bei Inkubation mit jeweils Glucose (—), Saccharose (-----) und Fructose (-·-·-·-). Bei den einzelnen Untersuchungen lief jeweils ein Warburggefäß ohne Substratzusatz als Bakterienleerwert (BLW) mit; diese Werte dienen als Maß für Umsetzungen aus Nebenreaktionen, die auch saure Produkte freisetzen können.

Tabelle 2

	Glucose	Saccharose	Fructose	Versuchsdauer nach Substrat- zugabe
St/200	2,46	2,70	3,73	5,0 Std.
St/205	2,68	1,98	2,58	5,0 Std.
St/249	4,88	4,18	4,50	5,0 Std.
St/291	1,80	1,66	1,01	6,0 Std.
St/292	0,40	0,53	0,38	7,5 Std.

Die untersuchten fünf Bakterienstämme verhalten sich sehr unterschiedlich in Bezug auf ihre Anfangssteigungen; bei Stamm St/200, St/205 und St/291 sind die Anfangssteigungen während der ersten 60 Minuten ähnlich, bei Stamm St/249 sind sie steiler und bei St/292 erheblich flacher.

Die Steigung der Kurven, als Maß für die Geschwindigkeiten der Umsetzungen nach Zusatz der Substrate, zeigt bei allen Versuchen eine auffällige Abhängigkeit von der Versuchsdauer; und zwar ist bei kurzer Versuchsdauer der Anstieg steiler als bei längerer Versuchsdauer. Die Werte sind in Tabelle 2 angegeben.

Die Versuchsdauer lag bei den einzelnen Untersuchungen zwischen 5 1/2 und 8 Stunden. Die Versuche wurden von uns als beendet angesehen, wenn in den beiden letzten Versuchsstunden keine oder nur eine geringfügige Steigerung der CO_2 -Produktion manometrisch abgelesen werden konnte. Maximal wurde die Versuchsdauer auf 8 Stunden begrenzt, auch wenn noch eine manometrisch meßbare CO_2 -Produktion andauerte.

V. Diskussion

Wesentliches Ziel dieser Arbeit war der Vergleich der Abbaugeschwindigkeiten zwischen den drei verschiedenen Zuckern Saccharose, Glucose und Fructose einerseits und zwischen den fünf verschiedenen Bakterienstämmen andererseits. Als Maß für die Abbaugeschwindigkeiten der Zucker wurde die CO_2 -Entwicklung während der ersten 60 Minuten nach Substratzusatz gewertet. Bei der Auswertung beschränkten wir uns deshalb auf die 60 Minuten nach Substratzugabe, d.h. 90 Minuten nach Versuchsbeginn, weil man berücksichtigen muß, daß das Absinken der anfangs stark steigenden CO_2 -Produktion zwei Ursachen haben kann:

1. Substraterschöpfung: Setzt man voraus, daß die gesamte Zuckermenge von 25_{μ}M zu Milchsäure abgebaut wird, müßte es zu einer manometrisch meßbaren CO_2 -Produktion von 1120_{μ}l kommen. Die Werte, die wir in unseren Versuchen ermittelt haben, zeigten als höchstes Maß bei Stamm St/249 etwa nur ein Drittel dieser CO_2 -Menge. Die anderen Stämme wiesen nur ein Viertel bis ein Fünftel der maximal erreichbaren CO_2 -Produktion auf.

2. Puffererschöpfung: Wenn kein CO_2 mehr freigesetzt wird, weil der Puffer erschöpft ist, muß der pH absinken. Bei pH-Kontrollen nach Versuchsende erhielten wir Werte zwischen pH 5,5 und pH 6,5. Demnach ist bei erniedrigtem pH noch freie Säure vorhanden, die von abgebautem Substrat stammt. Es wurde also mehr Substrat abgebaut als der freigesetzten CO_2 -Menge entspricht. Deshalb ist das absolut höchste Maß gemessener CO_2 -Mengen - die Kurvenhöhe - irrelevant.

Es wird in weiteren noch folgenden Versuchen das Verhältnis aus dem Verlust von nachweisbarem Substrat und gebildeter Milchsäure zu ermitteln sein. Wir können aufgrund unserer bisherigen Untersuchungen bei einem effektiv geringeren Säurebildungsvermögen nur Vermutungen über das Verbleiben der zugeführten Substrate anstellen. Die Zucker können als Ausgangssubstrat oder Zwischenprodukt liegenbleiben; auch können sie für die Synthese neuer Substanzen Verwendung finden. Ferner sollte diskutiert werden, ob andere Abbaumöglichkeiten als der Embden-Meyerhof-Weg in Betracht kommen und von biologischer Bedeutung sind.

Die bei unseren Versuchen verwandten fünf Bakterienstämme können die drei Zucker Glucose, Saccharose und Fructose verwerten und wenigstens zu einem gewissen meßbaren Teil zu sauren intermediären Stoffwechselprodukten abbauen. Die Abbaugeschwindigkeiten sind bei jedem einzelnen Stamm für die drei Zucker etwa gleich. Unterschiedliche Ergebnisse bei Verwendung desselben Stammes an verschiedenen Versuchstagen können durch Schwankungen verursacht werden, die auf Zufälligkeiten beim Überimpfen oder auf einer Inhomogenität der Zellproliferation beruhen. Ferner ist bekannt, daß metereologische Einflüsse während der Bakterienaufzucht und auch zeitweise während der Versuchsdauer zu Ungenauigkeiten der Ergebnisse führen.

Wir erhalten aus unseren Versuchen keinen Hinweis auf unterschiedliche kariogene Wirkungen der einzelnen Zucker, die von K.G. KÖNIG (13) im Tierversuch experimentell gezeigt wurden. Die drei Zucker Saccharose, Glucose und Fructose müssen aufgrund unserer Ergebnisse in ihren kariogenen Eigenschaften als gleichwertig angenommen werden.

Die scheinbare Divergenz unserer Befunde zu den tierexperimentellen Beobachtungen von K.G. KÖNIG sagt noch nichts über die Stichhaltigkeit der einen oder der an-

deren Aussage aus. Vor allem ist zu beachten, daß die Karies im Tierexperiment das Ergebnis aller am kariösen Prozeß beteiligter Faktoren ist. Hierzu gehören z.B. das Zusammenwirken verschiedener Mikroorganismen wie auch die Synthese von Polysacchariden (GIBBONS und KAPSIMALIS, 8). Über die Fähigkeit der hier untersuchten Steptokokken-Stämme zur Polysaccharidsynthese kann diese Arbeit aber nichts aussagen; es wurde vielmehr der Abbau der drei Zucker überprüft und verglichen.

Glucose und Fructose dürften theoretisch gleich geeignet sein, um zu Dextranen bzw. Lävanden als intra- und extra-zelluläre Polysaccharide aufgebaut zu werden. Dafür spricht auch die praktisch gleiche Abbaufähigkeit in unseren isolierten Kulturen. Lediglich Saccharose dürfte als Ausgangszucker für die Synthese von Polysacchariden Vorteile bieten, weil bei der Spaltung des Rohrzuckers Energie frei wird, die möglicherweise für die Synthese direkt verwendet werden kann. Zur Klärung dieser speziellen Frage sind weitere und andersartige Versuche erforderlich.

Um die Kariogenizität der verschiedenen Bakterienstämme beurteilen zu können, wurden bei den einzelnen Stämmen die Anfangsgeschwindigkeiten der Glycolyse gemessen. Bei

der Betrachtung eines Zuckers verhalten sich Stamm St/200, St/205 und St/291 in Bezug auf ihre Anfangsgeschwindigkeiten - gemessen an der CO_2 -Produktion innerhalb der ersten 60 Minuten - etwa gleich, Stamm St/249 produziert wesentlich mehr CO_2 , Stamm St/292 weniger. Die Geschwindigkeit der Säureentwicklung ist von der fermentativen Leistung des einzelnen Stammes abhängig. Es müssen die Plaquesbakterien als kariogen bezeichnet werden, die über lange Zeit saure Stoffwechselprodukte freisetzen; damit wird eine über längere Zeit dauernde Ätzwirkung auf die Zahnhartsubstanz ausgeübt.

VI. Zusammenfassung

Die Geschwindigkeit der Säurebildung von fünf verschiedenen Streptokokken-Stämmen aus Saccharose, Glucose und Fructose wurde bestimmt; gemessen wurde die CO_2 -Freisetzung aus einem Bikarbonat-Puffer im anaeroben Warburg-Ansatz während der ersten 60 Minuten nach Substratzugabe.

Die Abbaugeschwindigkeiten sind für die Stämme St/200, St/205 und St/291 ähnlich, Stamm St/249 setzt in den ersten 60 Minuten wesentlich mehr und Stamm St/292 weniger CO_2 frei.

In Bezug auf die Verwertbarkeit der drei einzelnen Zucker verhalten sich die Stämme ähnlich; es konnte bei keinem einzelnen Stamm eine Bevorzugung irgendeines Zuckers gefunden werden. Saccharose, Glucose und Fructose müssen in ihren kariogenen Eigenschaften auf Grund unserer Versuche als gleichwertig angenommen werden.

VII. Schrifttum

- 1.) Bramstedt, F., und Naujoks, R.: Kariesforschung an der Zahn-, Mund- und Kieferklinik der Universität Hamburg seit 1949. Dtsch. zahnärztl. Z. 13, 867-880 (1962).
- 2.) Bramstedt, F., und Ahrens, G.: Zahn und Speichel. Advanc. Fluorine Res. and Dental Caries Prevention 1, 135-150 (1963).
- 3.) Bramstedt, F., Naujoks, R., und Benedict, I.: "Oral sugar clearance" und Fermentaktivitäten im menschlichen Speichel. Dtsch. zahnärztl. Z. 18, 242-249 (1963).
- 4.) Bramstedt, F., Ranke, E., und Naujoks, R.: Experimentelle Beiträge zur Biochemie der Plaques und ihre Beziehung zur Zahnkaries. Advanc. Fluorine Res. and Dental Caries Prevention 2, 173-180 (1964).
- 5.) Bramstedt, F., Naujoks, R., und Benedict, I.: Über die Natur der von Streptokokken synthetisierten Polysaccharide. Advanc. Fluorine Res. and Dental Caries Prevention 3, 179-186 (1965).

- 6.) Fosdick, L.S.: Some new concepts concerning the role of sugar in dental caries. *Oral Surg.* 5, 615 (1952).
- 7.) Gibbons, R.J., und Socransky, S.S.: Intracellular polysaccharide storage by organisms in dental plaques: its relation to dental caries and microbial ecology of the oral cavity. *Arch. oral Biol.* 7, 73-80 (1962).
- 8.) Gibbons, R.J., und Kapsimalis, B.: Synthesis of intracellular iodophilic polysaccharide by *Streptococcus mitis*. *Arch. oral Biol.* 8, 319-329 (1963).
- 9.) Gibbons, R.J.: Storage of Carbohydrate by Plaque Microorganism and its Relationship to Dental Caries. *Advanc. Fluorine Res. and Dental Caries Prevention* 2, 211-212 (1964).
- 10.) Gibbons, R.J., Berman, K.S., Knoetter, P., und Kapsimalis, B.: Dental Caries, and alveolar Bone Loss in gnotobiotic Rats infected with capsule forming *Streptococci* of human origin. *Arch. oral Biol.* 11, 549-560 (1966).
- 11.) Gustafsson, B.E.: Germ-free rearing of rats. *Acta path. microbiol. Scand.* 73, (1948).

- 12.) Gustafsson, B.E.: The effect of different levels of carbohydrate activity in 436 individuals for five years. *Acta odont. scand.* 11, 232 (1954).
- 13.) König, K.G.: Möglichkeiten der Kariesprophylaxe beim Menschen und ihre Untersuchung beim kurzfristigen Rattenexperiment. Hans Huber, Bern und Stuttgart 1966 S. 98-100.
- 14.) Kröncke, A.: Freie Zucker im menschlichen Nüchternspeichel. Joh. Ambr. Barth, Leipzig 1959.
- 15.) Kröncke, A., und Lassig, C.: Amylaseaktivität und Atmung des menschlichen Speichels. *Arch. oral Biol.* 5, 31-37 (1961).
- 16.) Lundquist, C.: Oral sugar clearance. Its influence on dental caries activity. *Odont. Rev.* 3, Suppl. 1 (1952).
- 17.) Mathis, H.: *Caries dentium*. Wien 1947.
- 18.) Miller, W.D.: *Mikroorganismen der Mundhöhle*. Leipzig 1889.
- 19.) Naujoks, R., Bramstedt, F., Ranke, E., und Kröncke, A.: Beziehungen zwischen der Aldolaseaktivität des Speichels und der Karies. *Arch. oral Biol.* 4, 179-186 (1961).

- 20.) Neubauer, T., Bramstedt, F., und Naujoks, R.: Über die Aldolaseaktivität isolierter Stämme von Mikroorganismen der Mundhöhle. Stoma 14, 240-246 (1961).
- 21.) Pameijer, J.H.N., und Manly, R.S.: Enamel decalcification by natural dental plaque in sugar solutions. Arch. oral Biol. 7, 735-740 (1962).
- 22.) Ranke, B., Bramstedt, F., und Naujoks, R.: Untersuchungen mit markierten Verbindungen über Kohlenhydratabbau in den Plaques. Advanc. Fluorine Res. and Dental Caries Prevention 2, 189-193 (1964).
- 23.) Ranke, B., Ranke, E., und Bramstedt, F.: Biochemische Eigenschaften von Plaque-Streptokokken. Advanc. Fluorine Res. and Dental Caries Prevention 3, 173-178 (1965).
- 24.) Strålfors, A.: Investigations into the bacterial chemistry of dental plaques. Odont. Tidskrift 58, Nr. 3-4 (1950).
- 25.) Umbreit, W.W., Burris, R.H., und Stauffer, J.F.: Manometric Techniques. Burgess Publishing Co. Minneapolis, Minn. (1957).
- 26.) Warburg, O.: Über den Stoffwechsel der Tumoren. Berlin 1926.

Lebenslauf

Am 29. August 1943 wurde ich als Tochter des damaligen Hauptmannes der Luftwaffe Wolfgang Baron und seiner Ehefrau Edith, geb. Rennen, in Bad Godesberg geboren; ich bin das zweite von vier Kindern.

Von 1950 bis 1954 besuchte ich die Volksschule in Bad Essen, Ostercappeln und Köln-Lindenthal. Meine Gymnasialzeit begann ich an der Liebfrauen-Schule in Köln, setzte sie im St. Angela-Internat Haste fort und beendete sie 1963 mit dem mathematisch-naturwissenschaftlichen Abitur am Gymnasium für Mädchen in Osnabrück.

Mein Studium der Zahnheilkunde begann ich im SS 1963 an der Universität Köln; die weiteren Semester absolvierte ich an der Universität Erlangen und Bonn. Meine zahnärztliche Vorprüfung bestand ich am 6. November 1965 in Erlangen und meine zahnärztliche Prüfung am 24. Juni 1968 ebenfalls an der Universität Erlangen-Nürnberg. Am 9. Juli 1968 erhielt ich meine Bestallung als Zahnärztin.

Am 14. September 1968 heiratete ich den Arzt Dr. Friedhelm Meschede aus Meschede.

